

양돈 환경유래 *Escherichia coli*의 항균제 내성 및 유전적 특성

부산광역시 보건환경연구원¹, 경북대학교 수의과대학², 대구광역시 보건환경연구원³,
국립수의과학검역원⁴

최성화¹ · 이영주^{2*} · 김봉환² · 김기석² · 박청규² · 배동화²
조재근³ · 김종완⁴ · 김병한⁴ · 강민수⁴

Antibiotic Resistance and Genotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Pig Farm Environment

Seung-Hwa Choi¹, Young-Ju Lee^{2*}, Bong-Hwan Kim², Ki-Seuk Kim², Cheong-Kyu Park²,
Dong Hwa Bae², Jae-Keun Cho³, Jong-Wan Kim⁴, Byoung-Han Kim⁴ and Min-Su Kang⁴

¹Busan Metropolitan City Research Institute of Health & Environment, Busan, 613-806, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea

³Daegu Metropolitan City Research Institute of Health & Environment, Daegu, 706-732, Korea

⁴National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, 430-824, Korea

Received : June 20, 2006

Accepted : August 9, 2006

The use of antibiotics, including therapeutically in human and veterinary medicine, or as prophylaxis of growth promotion in animal husbandry, ultimately exerts selective pressure favorable for the propagation of antibiotic resistant bacteria. In this study we have determined the resistance for antibiotics of *E. coli* from pig farm environment, and investigate genetic relatedness by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Six farms were randomly selected in Gyeongsanman-do and Busan provinces for collecting samples from feces, manure and underground water. A total of 88 isolates from feces, 74 isolates from manure and 1 isolate from underground water were analyzed by antibiotic resistance and RAPD. Antibiotic resistance testing was performed by disk diffusion method using 16 antibiotics. The highest percentage of antibiotic resistance of isolates from feces and manure was found to the following antibiotics; tetracycline (100% and 100%), sulfamethoxazole/trimethoprim (60.2% and 62.2%), streptomycin (50.0% and 68.9%), chloramphenicol (56.8% and 56.8%), ampicillin (50.0% and 81.1%) and cephalothin (50.0% and 51.4%). Of isolates from feces and manure, 22.7% and 20.3% showed multiple resistance to 4 and 5 antibiotics, respectively. The isolates from GE pig farm showed six RAPD patterns. A single pattern, RAPD-C, was predominant in feces isolates (50.0%) and manure isolates (46.7%), and the rest of feces isolates showed RAPD-A, B and E pattern and manure isolates showed D and E pattern. One isolate from underground water showed F pattern. The appearance of multiresistant in *E. coli* isolates from pig farms environment is a problem of major concern of public health and RAPD may offer an useful tool of discrimination for the epidemiological investigation.

Key Words: *Escherichia coli*, Antibiotic resistance, Randomly amplification of polymorphic DNA

*교신저자: 이영주, 702-701, 대구광역시 북구 산격동 1370번지, 경북대학교 수의과대학
Phone: 82-53-950-7793, Fax: 82-505-950-7793, e-mail: youngju@knu.ac.kr

서 론

화학구조와 작용기전에 따라 15개 이상의 계열이 있는 것으로 알려져 있는 항균제는 (26), 가축에서는 질병치료와 아울러 성장촉진, 사료효율 향상을 목적으로 사료 및 음수에 끊임없이 사용되고 있다. 이러한 항균제의 지속적인 사용은 유해한 병원성 세균의 감소와 함께, 한편으로는 가축 장내의 정상세균총에까지 영향을 미쳐 항균제 내성균을 유발하고 있다 (11,13,16).

국내 축산분야에 있어서 항균제의 오용 및 남용은 약제내성균 출현으로 인한 환축의 치료효율 저하와 축산물에서의 잔류로 인한 국내·외 병원에서의 약제내성균 출현 및 동물 유래 약제내성균의 인체 전파 가능성 제기 등 많은 문제점을 야기시키고 있다. 한 예로 질병예방을 위한 사료첨가용 항균제인 avoparcin은 동일한 glycopeptide 항균제 계열에 속하는 인체용 vancomycin에 내성을 가진 세균인 vancomycin-resistant enterococci (VRE)의 발생을 유발하였으며 따라서 최근에는 동물용 avoparcin 사용을 금지하는 등 사료첨가용 항균제의 사용을 엄격히 제한하거나 최소화하려는 추세로 변화되어 가고 있다 (2,12). 또한 스웨덴은 1986년 모든 성장촉진용 항균제를 가축에 사용하는 것을 금지하였고, 덴마크는 1995년과 1998년에 각각 avoparcin과 virginiamycin의 사용을 금지, EU는 1999년 avoparcin, bacitracin, spiramycin, tylosin 및 virginiamycin 등 5가지 항균제를 성장촉진 목적으로 사용하는 것을 금지하였다 (9,24). 국내에서도 이미 1990년에 chloramphenicol의 수산용 및 식용동물에의 사용을 금지하였으며, 1997년에 avoparcin의 수입을 금지, 2003년부터는 spiramycin, spectinomycin, avoparcin, olaquinox, flubendazole 및 aprinocid 6종을 배합사료 제조용으로 사용하는 것을 금지하는 등 (3), 세계 각국이 축산용 항균제의 오·남용에 따른 문제를 지적하고, 이에 따른 항균제의 신중한 사용을 요구하고 있는 실정이다.

최근에는 분자생물학적 기법의 발달과 함께 내성균주간 연관성을 규명하는 방법들이 많이 보고되고 있으며, 특히 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction enzyme analysis 등이 가축과 사람유래 내성균주의 유전적 연관성 분석에 응용되고 있으며, 이를 통해 내성균의 전파가 서로 유기적으로 이루어지고 있는지 연구되고 있다 (8,25).

가축 사료와 함께 투여된 항균제는 분변을 통해 축산 주변에 서식하는 유해 미생물의 항균제 내성을 가속화시킬 수 있다는 주장이 거론되어지고 있으며, Sengelov 등 (23)은 돼지 축산 폐수를 이용하여 처리된 퇴비 주변의 토양에서 분

리된 *E. coli*의 tetracycline 내성 정도가 높아지는 것으로 보고하여 궁극적으로 사육시설 주변의 토양, 지하수 및 하천으로의 내성균 오염이 인류의 건강에 직·간접적으로 위협을 줄 수 있다고 하였다. 그러나 실제로 국내에서는 가축 분변 이외에 축산 환경 중에서 항균제 내성균을 분리한 사례가 정 (4)의 보고 외에는 거의 없는 실정으로 본 연구에서는 축산 농가 중에서도 가장 항균제 사용량이 많다고 보고 (3,4,20)된 돼지농가를 대상으로 가축의 주요 정상세균총이면서 인체에 감염되었을 경우 설사, 요로감염증, 복막염 및 신생아 패혈증 등 다양한 질환 (5)을 유발할 수 있는 *E. coli*를 돼지 분변, 축산 폐수를 이용한 퇴비, 그리고 농가에서 음용하고 있는 지하수에서 분리하여 항균제 내성 정도와 내성패턴 및 그 역학적 특성을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상농장 및 공시재료

2005년 5월부터 8월까지 부산 및 경남지역 6개 양돈장을 대상으로 시료를 채취하였다. 각각의 농장별로 분변은 돈사 바닥에 떨어진 신선변 5 g을, 퇴비는 퇴비저장소에서 1~2일 이내의 것으로 5 g을 채취하여 하나의 시료로 하였으며 각 농장별로 10개씩의 시료를 채취하였고, 지하수는 1 L를 하나의 시료로 하여 농장별로 1개 또는 2개 채취하였다. 모든 시료는 냉장운반 하였으며 24시간 이내에 *E. coli* 분리를 실시하였다.

2. 균분리 및 동정

균분리 방법은 '축산물의 가공기준 및 성분규격' (1) 및 '먹는물수질오염공정시험방법' (7)을 참고하여 수행하였는 바, 분변 및 퇴비는 증균 과정 없이 MacConkey agar (Difco, USA)에 직접 도말하고 37℃에서 18~24시간 배양하여 붉은 벽돌색 집락을 eosin methylene blue agar (EMB agar; Difco)에 재도말 하였으며, 지하수는 10 ml의 2배 농후 Lactose broth 10개의 중시험관에 접종하여 35℃에서 24시간 배양한 다음, 가스가 발생한 시험관에 대하여 EC medium에서 가스산생을 확인하고 EMB agar에 재도말하였다. EMB agar에 재도말된 분변, 퇴비 및 지하수 시료는 35℃에서 24시간 배양하였으며, 금속성의 광택집락에 대하여 그람염색, MUG시험, IMViC 시험 및 유당으로부터 가스생성시험을 실시하고 의심되는 집락에 대하여 API 20E strip (bioMerieux, France)을 이용하여 최종 동정하였다. 하나의 시료에서 3~5개의 의심되는 집락을 선별하였으며, 그 중 최종 동정이 확인된 집락 2개에 대해 항균제 내성시험을 실시하고 내성경향이 동일한 균주는 하나의 균주로 하였다.

Table 1. Isolation frequency of *E. coli* from pig farm environment

Farm	Province	No. of pigs housed	Feces		Manure		Underground water	
			No. of sample	No. of isolates	No. of sample	No. of isolates	No. of sample	No. of isolates
GA	Busan	500	10	14	10	12	2	0
GB	Busan	1,000	10	13	10	10	2	0
GC	Busan	500	10	11	10	1	1	0
GD	Jinju	2,000	10	18	10	19	1	0
GE	Sacheon	1,000	10	20	10	15	1	1
GF	Kimhae	800	10	12	10	17	1	0
Total	-	-	60	88	60	74	8	1

3. 항균제 내성시험

분리된 대장균에 대한 항균제 내성시험은 NCCLS (18)에 따라 디스크확산법으로 실시하였으며, 사용된 BBL antibiotic disk는 Becton-Dickinson (USA)에서 판매되는 17종의 항균제로, ampicillin (Am), amoxicillin/clavulanic acid (Amc), cephalothin (Cf), cefozolin (Cz), cefoxitin (Fox), cefotaxime (Ctx), cefepime (Fep), imipenem (Ipm), streptomycin (S), gentamicin (Gm), amikacin (An), ciprofloxacin (Cip), norfloxacin (Nor), trimethoprim/sulfamethoxazole (Sxt), chloramphenicol (Cp) 및 tetracycline (Te)이었다. 시험방법은 분리균주를 Mueller hinton broth (Difco)에 배양한 후, 균농도를 Mcfarland No. 0.5로 조정하고, 멸균 면봉을 이용하여 두께가 4 mm인 Mueller hinton agar (Difco)에 도포하였다. 균액 도말 후 15분 이내에 항균제 디스크를 dispenser로 접종하였으며, 37℃에서 16~18시간 배양한 후 균 억제대의 크기를 관찰하여 내성여부를 판정하였다. 분리균의 내성범위는 NCCLS의 기준에 따라 판정하였으며, 내성패턴의 분석은 중간내성은 제외시키고 완전한 내성을 나타내는 균주만을 대상으로 하였다.

4. Chromosomal DNA 추출 및 RAPD

동정이 확인된 균주를 Nutrient agar (Difco)에 배양한 후, DNA purification kit (Promega, USA)을 이용하여 단일집락으로부터 genomic DNA를 추출하여 사용하였다. RAPD를 위한 primer는 Regua-Mangia 등 (21) 및 Pacheco 등 (19)이 이미 보고한 1253 (5'-GTTTCCGCC-3')으로 GeneAmp PCR system 9600 thermocycler (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, USA)를 이용하여 실시하였다. PCR은 50 µl 반응용 AccuPower PCR premix [2.5 U Taq DNA polymerase, 250 µM each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, stabilizer and tacking dye] (Bioneer,

Korea)에 DNA 3 µl와 primer 30 pmole을 사용하였다. PCR 반응조건은 94℃에서 4분 (denaturation), 37℃에서 4분 (annealing) 및 72℃에서 4분간 (extension) 4 cycle을 수행한 후, 다시 94℃에서 1분 (denaturation), 37℃에서 1분 (annealing) 및 72℃에서 2분간 (extension) 30 cycle을 수행하였으며 postextension을 72℃에서 10분간 수행하였다. 최종 증폭산물은 2% agarose gel을 사용하여 4 V/cm의 전압으로 2시간 전기영동하여 확인하였다.

결 과

양돈 환경유래 대장균에 대한 항균제 내성과 그 역학적 특성을 파악하기 위해 부산 및 경남지역 6개 양돈장을 대상으로 분변, 퇴비 및 지하수에서 *E. coli* 분리를 실시한 결과는 Table 1과 같이 분변 60개 시료에서 88주, 퇴비 60개 시료에서 74주 및 지하수 8개 시료에서 1주의 *E. coli*가 분리되었다.

시료별 분리된 *E. coli*의 항균제 내성시험결과는 Table 2와 같다. 분변 및 퇴비유래 *E. coli* 분리주 모두 Imp에 대하여 감수성을 나타내었으며, Amc, Cz, Fox, Ctx, Fep, Gm, An, Cip 및 Nor의 9종에 대하여는 분변유래 분리주는 1.1~12.5% 및 퇴비유래 분리주는 2.7~23.0%의 내성율을 보였다. 또한 분변유래 분리주는 Te (100%), Sxt (60.2%), Cp (56.8%), S (50.0%), Am (50.0%) 및 Cf (50.0%) 순으로, 퇴비유래 분리주는 Te (100%), Am (81.1%), S (68.9%), Sxt (62.2%), Cp (56.8%), 그리고 Cf (51.4%) 순으로 50% 이상의 내성율을 나타내었다. 지하수유래 *E. coli* 1주는 Te, Cp 및 S에 대하여만 내성을 보였다.

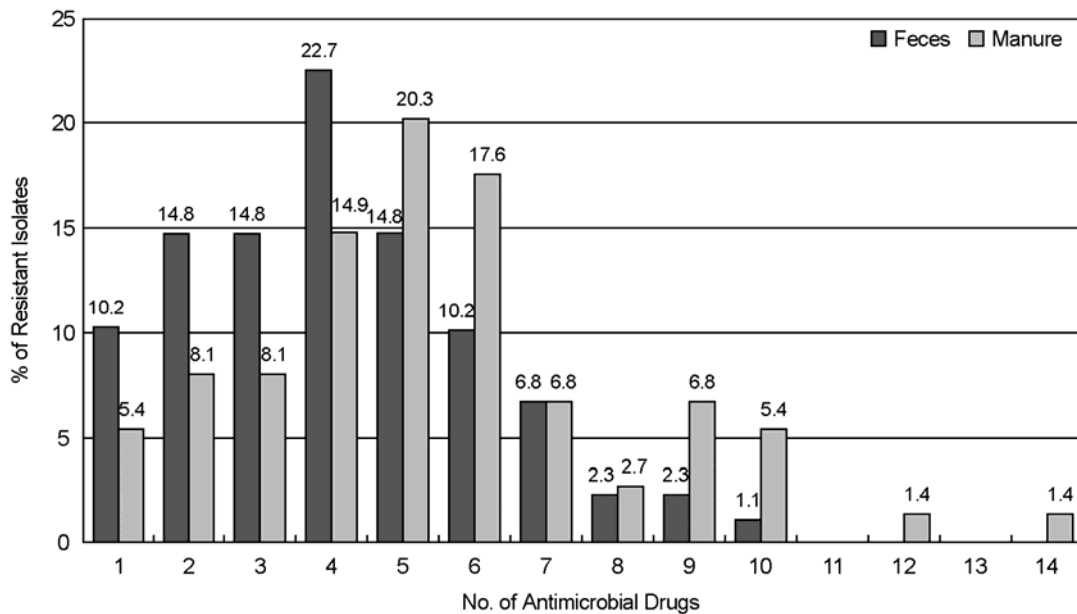
분변 및 퇴비유래 *E. coli* 분리주의 다제내성율을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 분변 및 퇴비유래 분리주의 89.8% 및 94.6%가 두 가지 이상의 항균제에 대한 다제내성을 보였으며, 3종 이상에 대한 다제내성균은 분변과 퇴비유래 분리주

Table 2. Antimicrobial resistance of *E. coli* isolates

Sample	No. of isolates tested	Type**	No. (%) of resistant isolates*															
			Am	Amc	Cf	Cz	Fox	Ctx	Fep	Ipm	S	Gm	An	Cip	Nor	Sxt	Cp	Te
Feces	88	R	44 (50.0)	2 (2.3)	44 (50.0)	3 (3.4)	1 (1.1)	1 (1.1)	1 (1.1)	0 (0.0)	44 (50.0)	11 (12.5)	1 (1.1)	9 (10.2)	7 (8.0)	53 (60.2)	50 (56.8)	88 (100)
		I	10 (11.4)	12 (13.6)	37 (42.0)	31 (35.2)	21 (23.9)	44 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	33 (37.5)	12 (13.6)	11 (12.5)	14 (15.9)	1 (1.1)	4 (4.5)	4 (4.5)	0 (0.0)
Manure	74	R	60 (81.1)	7 (9.5)	38 (51.4)	12 (16.2)	11 (14.9)	2 (2.7)	6 (8.1)	0 (0.0)	51 (68.9)	16 (21.6)	2 (2.7)	17 (23.0)	13 (17.6)	46 (62.2)	42 (56.8)	74 (100)
		I	4 (5.4)	34 (45.9)	32 (43.2)	36 (48.6)	19 (25.7)	41 (55.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (23.0)	15 (20.3)	11 (14.9)	13 (17.6)	9 (12.2)	4 (5.4)	6 (8.1)	0 (0.0)
Under-ground water	1	R	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.)	1 (100.)
		I	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

* AM, ampicillin; Amc, amoxicillin/clavulanic acid; Cf, cephalothin; Cz, cefozolin; Fox, cefoxitin; Ctx, cefotaxime; Fep, cefepime; Ipm, imipenem; S, streptomycin; Gm, gentamicin; An, amikacin; Cip, ciprofloxacin; Nor, norfloxacin; Sxt, trimethoprim/sulfamethoxazole; Em, erythromycin; Cp, chloramphenicol; TE, tetracycline.

** R, Resistance; I, Intermediate

**Figure 1.** Distribution of multiresistant *E. coli* isolates.

의 각각 75.0%와 85.1%에서 관찰되었고, 특히 분변에서는 4종 항균제에 대한 내성율이 22.7%, 퇴비에서는 5종 항균제에 대한 내성율이 20.3%를 보여 가장 높게 나타남을 알 수 있었다. 또한 퇴비유래 분리주의 경우 12종 및 14종 항균제에 대한 다제내성군도 관찰되었다.

조사대상 농가 중 분변, 퇴비 및 지하수에서 모두 다제내성균이 분리된 GE 농가를 대상으로 RAPD를 이용한 역학적

상관성 조사를 실시한 결과, 분리주 총 36주에서 보인 RAPD 패턴은 Fig. 2와 같다. 즉, 200 bp에서 5,000 bp 사이에서 4~11개의 특이 증폭산물을 형성하면서 A~F까지의 6형의 특이패턴으로 구분되었다. 시료별 분리주의 특이패턴 분포도는 Table 3과 같이, 분변에서는 A (10%), B (30%), C (50%) 및 E (10%) 패턴을, 퇴비에서는 C (46.7%), D (33.3%) 및 E (20.0%) 패턴을, 지하수에서는 F 패턴만을 보여 시료채취 장

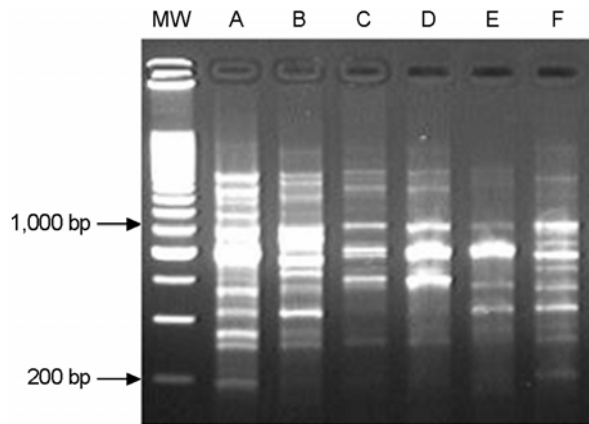


Figure 2. Representative RAPD fingerprinting profiles of *E. coli* isolates from E farm. Lane MW contains the 200 bp ladder molecular size marker.

소에 따라 패턴의 분포양상에 차이가 있는 것으로 나타났다.

고 찰

2005년 5월부터 8월까지 부산·경남지역 6개 양돈장의 양돈 환경에서 분리한 *E. coli* 163주를 대상으로 국내 가축에 주로 사용되고 있는 16종의 항균제에 대한 내성시험을 실시한 결과, 공시균의 50% 이상이 내성을 나타내는 항균제는 Te, Sxt, Cp, S, Am 및 Cf 6종이었다. 특히 분변, 퇴비 및 지하수유래 *E. coli* 분리주 100%가 Te에 내성을 나타내어 가장 높은 내성을 보였는 바, 이는 Te제제가 사료첨가용으로 국내에서 가장 많이 사용됨에 따라 (6) 본 약제에 지속적으로 노출되었기 때문인 것으로 판단된다. 또한 Longlois 등 (15)의 보고에 의하면 Te의 사용이 금지된 이후에도 몇 년간 지속적으로 내성균이 존재하는 것을 알 수 있으며, 따라서 Te에 이미 내성을 획득한 균은 본 제제의 사용이 중단되어도 지속적으로 농가에 존재하는 것으로 추측된다.

본 연구에서 분리된 분변유래 *E. coli* 총 88주 중, Sxt에는 53주 (60.2%), Cp에는 50주 (56.8%) 그리고 S, Am 및 Cf에는 모두 44주 (50%)가 내성을 나타내었다. Dunlop 등 (10)은 캐나다의 돼지 분변유래 *E. coli*의 96.9%가 Te에 내성을 나타냄을 보고함과 아울러, 49.6%가 Am에 내성을 나타냄을 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었으며, Saenz 등 (22)은 스페인의 돼지 분변유래 *E. coli* 중 68.0%가 Te에 내성을 보였으나 Am에는 29.0%, C에는 15.0%가 내성을 나타내었음을 보고하였고, Lanz 등 (14)은 스위스의 돼지 분변유래 *E. coli*의 54.0%가 Te에, 16.0%는 Am에, 10.0%는 Cp 내성을 나타냄을 보고한 바 있다. 또한 Raida 등 (20)은 미국의 돼지 분변유래 *E. coli*에서 Te와 Am에 대하여 전혀 내성

Table 3. Distribution of RAPD fingerprinting profiles of *E. coli* isolates from E farm

Fingerprinting type	No. (%) of isolates		
	Feces	Manure	Underground water
A	2 (10.0)	0 (0)	0 (0)
B	6 (30.0)	0 (0)	0 (0)
C	10 (50.0)	7 (46.7)	0 (0)
D	0 (0)	5 (33.3)	0 (0)
E	2 (10.0)	3 (20.0)	0 (0)
F	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Total	20 (100)	15 (100)	1 (100)

을 나타내지 않았음으로 보고하였던 바, 이러한 내성율의 차이는 각 국가별 사용 항균제의 종류 및 사용량 등에 기인된 것으로 판단되며, 유럽 등 선진국에서의 항생제 내성율이 본 연구와 비교하여 좀 더 낮게 나타내는 것은 이미 오래전부터 이들 국가에서는 항균제 오남용에 의한 내성균 출현 모니터링을 실시하고 그 결과, 항균제 내성율의 증감분석을 통하여 항균제 사용량 감소 등 철저한 관리를 실시한 결과로 생각된다. 그러나 국내에서 1990년부터 식용가축에 대하여 Cp의 사용을 금지하였음에도 불구하고 내성율이 50% 이상으로 여전히 높은 것으로 보아 내성균이 환경중에 노출되면 오랜 시간 동안 존재하게 되는 것으로 판단된다. Cp에 대한 내성균은 일반적으로 tetracycline계 및 sulfa계 등과 동시에 높은 내성을 나타내고 있으며 따라서 동일한 plasmid내 내성 gene의 존재여부에 대한 추가적인 연구 및 이와 더불어 식용가축 이외의 동물에는 사용이 허가된 본 제제가 식용가축에 임의적으로 사용되고 있는지에 대한 추적 조사가 필요할 것으로 판단된다.

최근 인의분야에서도 임상적으로 3세대 cepha계 항균제를 포함하는 β -lactam계에 대하여 다양한 내성경향을 나타내고 있으며, 이러한 다제내성균이 병원내 환경에서 서식하면서 흔히 병원내 감염의 원인이 되며 약제내성을 지배하는 유전인자인 전달성 plasmid의 작용으로 동일한 균종간 또는 전혀 다른 균종간에도 내성이 쉽게 확산될 수 있다고 보고되고 있다 (5,17). 본 연구에서는 Ctx에 대하여 분변에서는 1주 (1.1%), 퇴비에서는 2주 (2.7%)만이 내성을 나타내었으나, 중간내성을 보이는 균주가 분변, 퇴비 및 지하수에서 각각 44주 (50.0%), 41주 (55.4%), 1주 (100%)로 나타나 3세대 cepha계 항균제에 대한 내성균 또한 공중보건학적으로 잠재적인 문제가 될 수 있음을 알 수 있었다.

본 실험에 사용한 16종의 항균제에 대한 내성양상의 분

석시 공시균 163주 모두 1종 이상의 항균제에 대한 내성을 나타내었으며 3종 이상에 대한 내성율은 분변, 퇴비 및 지하수유래 분리주 각각 66주 (75.0%), 63주 (85.1%) 및 1주 (100.0%)로 나타났다. 정 등 (4)이 전국 5개 도를 대상으로 돼지 주변 환경유래 *E. coli* 중 3종 이상의 다제내성주를 분변에서 8주 (61.6%), 퇴비에서 3주 (50.1%), 지하수유래 1주 (100.0%)로 보고한 것과 비교하여 본 실험결과가 다소 높은 것으로 나타났으나 이는 부산 및 경남지역만을 대상으로 보다 많은 시료에 대한 시험을 실시하였기 때문으로 보여진다. Raida 등 (20)은 미국의 가축 및 사람 분변에서 3종 이상의 항균제에 대하여 다제내성을 나타내는 *E. coli*가 14.0%이었고, 축사 및 퇴비 등의 농장 환경유래에서는 13.8%이었다고 보고하여 국내 양돈 환경유래 분리주의 다제내성율이 상대적으로 상당히 높음을 짐작할 수 있었다. 또한 본 연구에서 분리된 지하수유래 *E. coli* 모두 3종 이상 항균제에 대한 다제내성양상을 보여 사육 단계에서 생겨난 내성균들이 궁극적으로 동물의 분변을 통해 결국 지하수까지 오염되고 있음을 추측할 수 있었으며 또한 이러한 사항들은 지하수를 농가 등에서 음용수로 사용하고 있다는 점에서 공중보건학적으로 국민의 건강에 직접적인 영향을 미칠 수 있다고 판단되며 앞으로 더 깊은 연구가 필요한 부분이라고 여겨진다.

동일농가 유래 돼지분변과 퇴비 그리고 지하수에서 분리된 다제내성 *E. coli* 36주에 대한 RAPD 시험결과, 총 6개의 패턴 중 분변과 퇴비에서는 2개의 패턴만이 일치하였으며 지하수에서는 일치하는 패턴이 나오지 않음으로써 역학적인 상관성을 추론하기는 어려웠다. 정 등 (4) 또한 돼지농장 분변과 주변하천에서 검출된 *E. coli*에 대해 PFGE를 통한 유전학적 유사성을 연구하였으나 서로 연관관계가 매우 낮은 것으로 보고하였던 바, 최근 들어 사람과 축산 환경에 있어서의 내성균의 전파가 서로 유기적으로 이루어지고 특히 가축에 의한 내성균의 전파가 분자유전학적 분석에 의하여 밀접한 관계가 있는 것이 규명되고 있는 추세에 비추어 (8,25) 다소 상이한 결과로 보인다. 그러나 Sengelov 등 (23)은 양돈 농가 퇴비를 처리한 토양유래 세균의 Te내성율이 일반토양 유래 세균보다 더 높았음을 보고한 바 있으며, 이러한 차이는 환경에 오염된 내성균들은 잔존의 시간의 오래되어 사육 당시 분변유래 세균과는 내성율에 차이를 보일 수 있을 것이라 추측을 하고 향후 좀 더 많은 시료에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

이상의 결과로 국내 양돈 환경유래 *E. coli*의 항균제에 대한 높은 내성율을 확인할 수 있었으며, 이는 농장에서 치료용 뿐만 아니라 성장촉진 및 질병예방 목적으로 항균제를 무분별하게 사용한 결과로 판단된다. 따라서 가축에 대한 항균제의 오·남용으로 인해 인류에 항균제와 관련한 위해가 토

양, 하천, 지하수 등에 영향을 미칠 수 있음을 감안하면 (4, 20), 항균제에 대한 강력한 사용규제와 더불어 축산 환경을 중심으로 그 내성경로 파악에 대한 연구가 더욱더 활발히 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

양돈 환경유래 대장균에 대한 항균제 내성과 그 유전적 특성을 파악하기 위해 부산 및 경남지역 6개 양돈장을 대상으로 분변, 퇴비, 지하수에서 *E. coli* 분리를 실시한 결과 분변에서 88주, 퇴비에서 74주, 지하수에서 1주를 분리하였다.

분리된 대장균 총 163주에 대한 항균제 내성시험결과, Imp에는 모두 감수성을 나타내었으며 Amc, Cz, Fox, Ctx, Fep, Gm, An, Cip 및 Nor 9종에는 10~20% 이하로 비교적 낮은 내성율을 보였다. Am, Cf, S, Sxt, Cp 및 Te 6종에 대하여는 50% 이상의 높은 내성율을 보였는 바, 분변유래 분리주는 Te (100%), Sxt (60.2%), Cp (56.8%), S (50.0%), Am (50.0%) 및 Cf (50.0%)에, 퇴비유래 분리주는 Te (100%), E (100%), Am (81.1%), S (68.9%), Sxt (62.2%), Cp (56.8%), 및 Cf (51.4%)에 높은 내성을 나타내었다. 분리된 대장균 모두는 한 가지 이상의 항균제에 대해서 내성을 보였으며, 3종 이상의 다제내성균의 비율은 분변과 퇴비에서 75.0%와 85.1%를 나타내었다.

분변, 퇴비 및 지하수에서 모두 다제내성균이 분리된 E 농가의 *E. coli* 36주에 대하여 RAPD를 실시한 결과, 6개의 패턴을 보였으며 분변에서는 A (10%), B (30%), C (50%) 및 E (10%) 패턴을, 퇴비에서는 C (46.7%), D (33.3%) 및 E (20.0%) 패턴을, 지하수에서는 F 패턴만을 보여 분리된 *E. coli*간의 유전적 패턴에 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- 1) 국립수의과학검역원: 국립수의과학검역원 고시 제 2003-14호: 축산물의 가공기준 및 성분규격. 150-181, 2002.
- 2) 이연희: 임상과 축산에서 발견되는 항균제의 내성균주의 현황. 한국수의공중보건학회 추계학술대회 특별연제. 43-54, 2003.
- 3) 정석찬: 축산용항생제 관리시스템 구축. The annual report of KFDA 8: 2223-2224, 2004.
- 4) 정윤희: 축산 환경 중의 항균제 내성균 모니터링. 식품의약품안전청 용역최종보고서. 2003.
- 5) 차인호: 설사환자로부터 분리한 대장균의 형별 분포 및 항균제 내성 유형. 생명과학회지 6: 262-272, 2000.
- 6) 하준일, 홍기성, 송시욱, 정석찬, 민영식, 신형철, 이기

- 옥, 임경중, 박종명: 축산 및 수산분야의 항생물질 사용 실태 조사. 한국수의공중보건학회지 **27**: 205-217, 2003.
- 7) 환경부: 환경부 고시 제 2002-91호: 먹는 물 수질오염 공정시험방법. 12-15, 2002.
 - 8) Avery SM, Liebana E, Reid CA, Woodward MJ, Buncic S: Combined use of two genetic fingerprinting methods, pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping, for characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from food animals, retail meats, and cases of human disease. *J Clin Microbiol* **40**: 2806-2812, 2002.
 - 9) Dermot JH, Helen HJ: Lessons from the Danish ban on feed-grade antibiotics. *Briefing Paper* 03-BP41: 1-9.
 - 10) Dunlop RH, McEwen SA, Meek AH, Clarke RC, Black WD, Friendship RM: Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Prev Vet Med* **34**: 283-305, 1998.
 - 11) Hanzawa Y, Oka C, Ishiguro N, Sato G: Antibiotic-resistant coliforms in the waste of piggeries and dairy farms. *Nippon Juigaku Zasshi* **46**: 363-372, 1984.
 - 12) Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, Whitlock JE: Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4930-4933, 2001.
 - 13) Klare I, Badstubner D, Konstabel C, Bohme G, Claus H, Witte W: Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandary. *Microb Drug Resist* **5**: 45-52, 1999.
 - 14) Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P: Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* **91**: 73-84, 2003.
 - 15) Loglois BE, Dawson KA, Leak I, Aeron DK: Antimicrobial resistance of fecal coliforms from pigs in a herd not exposed to antimicrobial agents for 126 months. *Vet Microbiol* **18**: 147-153, 1988.
 - 16) Mathew AG, Saxton AM, Upchurch WG, Chattin SE: Multiple antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from swine farms. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2770-2772, 1999.
 - 17) Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ: Nosocomial outbreak of Klebsiella infection resistant late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med* **119**: 353-359, 1993.
 - 18) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7th ed. M20A7. 2000.
 - 19) Pacheco AB, Guth BE, Soares KC, Nishimura L, de Almeida DF, Ferreira LC: Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from human. *J Clin Microbiol* **35**: 1521-1525, 1997.
 - 20) Raida SS, John BK, Yvette J, Roseann M: Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1394-1404, 2005.
 - 21) Regua-Mangia AH, Guth BC, da Costa Andrade JR, Irino K, Pacheco AB, Ferreira LC, Zahner V, Teixeira LM: Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**: 155-162, 2004.
 - 22) Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C: Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, food and humans in Spain. *Int J Antimicrob Agents* **18**: 353-358, 2001.
 - 23) Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB: Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ Int* **28**: 587-595, 2003.
 - 24) van den Bogaard AE, Bruinsma N, Stobberingh EE: The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* **46**: 146-148, 2000.
 - 25) Whittam TS, Wachsmuth IK, Wilson RA: Genetic evidence of clonal descent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* **157**: 1124-1233, 1988.
 - 26) WHO: Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans. *Fact Sheet No. 268*: 2002.